

## Bibliographic Fields

## Document Identity

(19)【発行国】	(19) [Publication Office]
日本国特許庁 (JP)	Japan Patent Office (JP)
(12)【公報種別】	(12) [Kind of Document]
公開特許公報 (A)	Unexamined Patent Publication (A)
(11)【公開番号】	(11) [Publication Number of Unexamined Application]
特開2000-178309 (P2000-178309 A)	Japan Unexamined Patent Publication 2000 - 178309 (P2000 - 178309A )
(43)【公開日】	(43) [Publication Date of Unexamined Application]
平成12年6月27日 (2000. 6. 27)	2000 June 27 days (2000.6 . 27)

## Public Availability

(43)【公開日】	(43) [Publication Date of Unexamined Application]
平成12年6月27日 (2000. 6. 27)	2000 June 27 days (2000.6 . 27)

## Technical

(54)【発明の名称】	(54) [Title of Invention]
着色ポリマー粒子およびその製造法	<b>DISCOLORED POLYMER PARTICLE AND ITS PRODUCTION METHOD</b>
(51)【国際特許分類第 7 版】	(51) [International Patent Classification, 7th Edition]
C08F 2/16	C08F 2/16
D06P 3/00	D06P 3/00
5/00	5/00
5/20	5/20
G01N 21/76	G01N 21/76
21/78	21/78
33/543 525	33/543525
541	541
33/545	33/545
【FI】	【FI】
C08F 2/16	C08F 2/16
D06P 3/00 F	D06P 3/00 F
5/00 D	5/00 D
5/20 C	5/20 C
G01N 21/76	G01N 21/76
21/78 C	21/78 C
33/543 525 G	33/543525 G

525 W

525 W

525 U

525 U

541 Z

541 Z

33/545 A

33/545 A

【請求項の数】

[Number of Claims]

8

8

【出願形態】

[Form of Application]

OL

OL

【全頁数】

[Number of Pages in Document]

7

7

【テーマコード(参考)】

[Theme Code (For Reference)]

2G0544H0574J011

2 G0544H0574J011

【F ターム(参考)】

[F Term (For Reference)]

2G054 AA02 AA06 AA10 AB04 BB05 CE01  
CE10 EA01 EA03 4H057 AA02 BA01 BA10  
CA03 CA38 CB16 CC02 DA02 DA29 DA32  
GA07 HA01 JA10 JA14 JB03 4J011 AA05  
AA08 AB09 BA08 BB01 BB11 BB13

2 G054 AA02 AA06 AA10 AB04 BB05 CE01 CE10 EA01  
EA03 4H057 AA02 BA 01 BA 10 CA03 CA38 CB16 CC02  
DA02 DA29 DA32 GA07 HA01 JA10 JA14 JB03 4J011  
AA05 AA08 AB09 BA 08 BB01 BB11 BB13

**Filing**

【審査請求】

[Request for Examination]

未請求

Unrequested

(21)【出願番号】

(21) [Application Number]

特願平10-357185

Japan Patent Application Hei 10 - 357185

(22)【出願日】

(22) [Application Date]

平成10年12月16日(1998. 12. 16)

1998 December 16 days (1998.12 . 16)

**Parties****Applicants**

(71)【出願人】

(71) [Applicant]

【識別番号】

[Identification Number]

390024442

390024442

【氏名又は名称】

[Name]

株式会社ワイエムシィ

KK YMC

【住所又は居所】

[Address]

京都市下京区五条通烏丸西入醍醐町284番  
地

Kyoto City Shimogyo-ku five provision Karasumaru west  
entrance Daigo Cho 284

**Inventors**

(72)【発明者】

(72) [Inventor]

## 【氏名】

民谷 栄一

## 【住所又は居所】

石川県能美郡辰口町旭台1-50 A棟15号

## (72)【発明者】

## 【氏名】

村上 裕二

## 【住所又は居所】

石川県能美郡辰口町旭台1-50 D棟33号

## (72)【発明者】

## 【氏名】

高橋 洋二

## 【住所又は居所】

石川県小松市国府台5丁目28番 株式会社ワイエムシ技術開発センター内

## (72)【発明者】

## 【氏名】

下村 泰志

## 【住所又は居所】

石川県小松市国府台5丁目28番 株式会社ワイエムシ技術開発センター内

## (72)【発明者】

## 【氏名】

清水 範英

## 【住所又は居所】

石川県小松市国府台5丁目28番 株式会社ワイエムシ技術開発センター内

## Agents

## (74)【代理人】

## 【識別番号】

100079234

## 【弁理士】

## 【氏名又は名称】

神崎 彰夫

## [Name]

People valley Eiichi

## [Address]

Ishikawa Prefecture Nomi-gun Tatsunokuchi-machi Asahidai  
1- 50 A tower 15 number

## (72) [Inventor]

## [Name]

Murakami Yuji

## [Address]

Ishikawa Prefecture Nomi-gun Tatsunokuchi-machi Asahidai  
1- 50 D Tower 33 number

## (72) [Inventor]

## [Name]

Takahashi Yoji

## [Address]

Inside of Ishikawa Prefecture Komatsu City Konodai  
5-Chome 28 turn KK YMC technological development center

## (72) [Inventor]

## [Name]

Shimomura Yasushi

## [Address]

Inside of Ishikawa Prefecture Komatsu City Konodai  
5-Chome 28 turn KK YMC technological development center

## (72) [Inventor]

## [Name]

clean water example England

## [Address]

Inside of Ishikawa Prefecture Komatsu City Konodai  
5-Chome 28 turn KK YMC technological development center

## (74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

## [Identification Number]

100079234

## [Patent Attorney]

## [Name]

Kanzaki Akio

**Abstract****(57)【要約】****【課題】**

水酸基をもった平均粒径 5~200  $\mu\text{m}$  のポリマー粒子の作製方法とこれらの粒子に着色することによって測定物質を定量もしくは定性することができる簡易方法を提供する。

**【解決手段】**

ポリマー粒子に 3 原色である赤、青、黄色の色素の混合物で染色し、各色素の吸光度スペクトルのピーク波長の割合から約 1 万色を識別し、免疫反応の有無を蛍光物質や発光物質の標識物を使用することによって確認できる。

**Claims****【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

疎水性モノマーと架橋剤を溶解した混合溶液を細径ノズルから、反応開始剤を溶解した水溶液中に噴出させて重合させることにより、平均粒径が 5~200  $\mu\text{m}$  であるほぼ均一な粒径を有し、色素分子が結合している着色ポリマー粒子。

**【請求項 2】**

疎水性モノマーと架橋剤を溶解した混合溶液を細径ノズルから、反応開始剤を溶解した水溶液中に噴出させて重合させることにより、平均粒径が 5~200  $\mu\text{m}$  であるほぼ均一な粒径を有し、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子が個別に結合し、各色素の吸光度スペクトルのピーク波長から個々に識別でき、且つそれぞれに試料中の特定物質を吸着または結合によって固定できる分析試薬。

**【請求項 3】**

疎水性モノマーおよび架橋剤を溶解して混合溶液を調製し、この溶液を細径ノズルからほぼ均一な速度で反応開始剤と界面活性剤を含む水中に噴出させ、さらに攪拌を加えて重合させることで平均粒径 5~200  $\mu\text{m}$  でほぼ均一な粒径を有し、さらに色素分子を結合させる着色ポリマー粒子の製造法。

**(57) [Abstract]****[Problems to be Solved by the Invention]**

preparation method of polymer particle of average particle diameter 5~200  $\mu\text{m}$  which had hydroxy group it colors to these particle with densely simple method which quantification or qualitative it is possible measurement substance is offered.

**[Means to Solve the Problems]**

You can dye with blend of dye of red and blue、yellow which are 3 primary colors in polymer particle can identify approximately 10,000 colors from ratio of peak wavelength of absorbance spectrum of each dye, you can verify the presence or absence of immune reaction label of phosphor and light emitting substance is used by densely.

**[Claim(s)]****[Claim 1]**

From fine diameter nozzle, jet doing mixed solution which melts hydrophobic monomer and crosslinking agent in aqueous solution which melts reaction initiator almost it possesses the uniform particle diameter where average particle diameter is 5 - 200  $\mu\text{m}$  by polymerizing, discolored polymer particle. which dye molecule has connected

**[Claim 2]**

From fine diameter nozzle, jet doing mixed solution which melts hydrophobic monomer and crosslinking agent in aqueous solution which melts reaction initiator three basic colors of red and the blue、yellow or dye molecule which is these blended color to possess uniform particle diameter where the average particle diameter is 5 - 200  $\mu\text{m}$  by polymerizing, almost, be able to connect individually, be able to identify individually from peak wavelength of the absorbance spectrum of each dye, At same time in each one specific substance in sample the analysis reagent. which can be locked with adsorption or connection

**[Claim 3]**

Melting hydrophobic monomer and crosslinking agent, production method. of discolored polymer particle where it manufactures mixed solution, jet it does this solution in underwater where from fine diameter nozzle almost reaction initiator and detergent are included with uniform velocity, by fact that you polymerize furthermore including churning possesses uniform particle diameter almost with average particle diameter 5~200  $\mu\text{m}$ , furthermore connects dye molecule

## 【請求項 4】

疎水性モノマーがスチレン、反応開始剤がラジカル重合開始剤であり、攪拌を加える反応溶液の温度をラジカル生成可能な 50~90 deg C に加温する請求項 3 記載の製造法。

## 【請求項 5】

疎水性染料で着色するために、水酸基を有するメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルおよび/またはカルボキシル基を有するメタクリル酸を混合溶液に 0.1~10%好ましくは 0.5~5%添加する請求項 3 記載の製造法。

## 【請求項 6】

疎水性染料による着色効率を高めるために、水によるポリマー粒子の洗浄後に、100~200 deg C で減圧乾燥することによって多孔質ポリマー粒子を得る請求項 3 記載の製造法。

## 【請求項 7】

平均粒径が 5~200  $\mu$ m であるほぼ均一な粒径を有するポリマー粒子について、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子を個別に結合させ、各着色ポリマー粒子に特定成分を固定し、ついで各着色ポリマー粒子の特定成分を試料と選択的に反応させてから、蛍光または発光物質を有する標識溶液を結合させて洗浄した後に、各着色ポリマー粒子の蛍光または発光度を測定する特定成分の分析方法。

## 【請求項 8】

平均粒径が 5~200  $\mu$ m であるほぼ均一な粒径を有するポリマー粒子について、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子を個別に結合させ、各着色ポリマー粒子に特定の抗体を感作し、ついで各着色ポリマー粒子の抗体を検体の抗原と免疫学的に反応させてから、蛍光または発光物質で標識化した2次抗体を結合させて洗浄した後に、各着色ポリマー粒子の蛍光または発光度を測定する免疫臨床診断方法。

## Specification

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

## [Claim 4]

hydrophobic monomer styrene、 reaction initiator being radical polymerization initiator, production method。 which is stated in Claim 3 which heats temperature of reaction solution which addschurning to radical production possible 50 - 90 deg C

## [Claim 5]

In order to color with hydrophobic dye, methacrylic acid which it possesses 2-hydroxyethyl methacrylate and/or carboxyl group where it possesses hydroxy group in mixed solution 0.1 - 10% preferably 0.5~5% the production method。 which is stated in Claim 3 which is added

## [Claim 6]

In order to raise coloration efficiency with hydrophobic dye , with waterafter washing polymer particle, reduced pressure drying it does with 100 - 200 deg C, the production method。 which is stated in Claim 3 which obtains porous polymer particle withdensely

## [Claim 7]

three basic colors of red and blue、 yellow or connecting dye molecule which is these blended color individually concerning polymer particle which almost possesses the uniform particle diameter where average particle diameter is 5 - 200; $\mu$ m, to lock specific component in each discolored polymer particle, after next specific component of each discolored polymer particle sample and selectively reacting, Connecting labelling solution which possesses fluorescence or light emitting substance, afterwashing, analytical method。 of specific component which measures fluorescence ordegree of light emitting of each discolored polymer particle

## [Claim 8]

three basic colors of red and blue、 yellow or connecting dye molecule which is these blended color individually concerning polymer particle which almost possesses the uniform particle diameter where average particle diameter is 5 - 200; $\mu$ m, sensitization to do thespecific antibody in each discolored polymer particle, after next antibody of each discolored polymer particle reacting to antigen and immunological of test agent, Connecting secondary antibody which labelling is done with fluorescence, or the light emitting substance after washing, immunity clinic diagnosis method。 which measures fluorescence or degreeof light emitting of each discolored polymer particle

## [Description of the Invention]

[0001]

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、ほぼ均一な粒径を有する着色ポリマー粒子およびその製造法に関し、赤、青、黄色の三原色の色素を基本としてすべて異なる色調に着色することにより、同定すべき物質に特異的に反応する抗体などの物質を個別に感作させ、多種類の物質を同時に同定できる着色ビーズ粒子およびその製造法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

多種類の物質を一時に同定する方法は、臨床診断試薬、環境汚染物質の分析、農薬の分析、遺伝子の分類、医薬品の検査、生化学分野などに利用可能である。

既存の同定方法として、公知の診断薬および診断システムにおいて、自動分析機器を使った多検体測定システムはあるが、粒径約 200  $\mu$  m 以下のポリマー粒子 1 個で対象物質を同定できるような診断薬および診断システムはない。

## 【0003】

例えば、ポリマー粒子の製造法として、ノズルを使ったパーク(T.G.Park)らの報告がある(Journal of Poly. Sci., Poly. Chem. Ed.,505-507,vol.30(1992))。

この製造法では、シリンダーの先から、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)、N,N-メチレンビス-アクリルアミド(MBAAm)、アルギン酸ナトリウム、テトラエチレンジアミン(TEMED)の混合溶液を滴下し、ポリマー粒子を形成している。

## 【0004】

また、着色粒子の製造法として、特開平 10-48215 号、特開平 8-269207 号、特開平 6-306108 号などが存在する。

特開平 10-48215 号では、スチレンと共重合性である不飽和の着色ラテックス粒子の製造について開示している。

特開平 8-269207 号では、溶剤または水に溶解したスチレンアクリル酸樹脂と着色剤を強力な剪断応力で混合し、着色剤を樹脂粒子内に浸

## [Technological Field of Invention]

this invention regards discolored polymer particle and its production method which almost possess the uniform particle diameter, sensitization doing antibody or other substance which reacts to specific in the substance which identification it should do individually by coloring to the color which differs entirely with dye of three basic colors of red and blue, yellow as basis, It regards coloration beads particle and its production method which simultaneously the identification it is possible substance of multiple kinds.

## [0002]

## [Prior Art]

substance of multiple kinds at one time method which identification is done, is useable in analysis of clinic diagnosis reagent, environmental contaminant, analysis of pesticide, classification of gene, inspection and biochemistry field etc of drug.

As existing identification method, in diagnostic reagent and diagnosis system of public knowledge, there are multi test agent measurement system which used automatic analysis equipment, but with polymer particle 1 of particle diameter approximately 200;  $\mu$  m or less there is not a diagnostic reagent or a diagnosis system which the identification it is possible target substance.

## [0003]

As production method of for example polymer particle, park which used nozzle (T.G. Park) and others there is report, (Journal of Poly. Sci., Poly. Chem. Ed., 505-507, vol.30 (1992)).

With this production method, from ahead cylinder, N-isopropyl acrylamide (NIPAAm), N, N-methylene-bis-acrylamide (MBA Am), the mixed solution of sodium alginate, tetraethylene diamine (TEMED) is dripped, polymer particle is formed.

## [0004]

In addition, Japan Unexamined Patent Publication Hei 10-48215 number, Japan Unexamined Patent Publication Hei 8-269207 number and Japan Unexamined Patent Publication Hei 6-306108 number etc exist as production method of coloration particle.

With Japan Unexamined Patent Publication Hei 10-48215 number, it has disclosed concerning production of coloration latex particle of unsaturated which is a styrene and a copolymerizability.

With Japan Unexamined Patent Publication Hei 8-269207 number, styrene acrylic acid resin and colorant which are melted in the solvent or water are mixed with strong shear

透させて着色マイクロカプセルを製造する方法が開示されている。

特開平 6-306108 号では、乳化重合法で製造し、水難溶性着色剤で染色した着色ラテックス粒子について開示している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

前記のパークらの報告を参照すると、通常の懸濁重合に比べて、比較的大きい粒径のポリマー粒子を形成できても、ポリマー粒子の粒径が相当に不均一になってしまう。

また、前記の諸公報で開示された方法で調製した着色ポリマー粒子は、比較的均一な粒径を有するけれども、一般に粒径が数  $\mu\text{m}$  以下である非常に細かい粒子であり、粒径を数十  $\mu\text{m}$  の大きさに均一化することは困難である。

このため、粒径数十  $\mu\text{m}$  のポリマー粒子を 1 個ずつ用い、各ポリマー粒子によって対象物質を同定するような測定用途に使用することは実際上不可能である。

【0006】

一方、特開平 5-273210 号では、粒径が 10  $\mu\text{m}$  以下の着色微粒子を用い、免疫反応が生じて溶液の色が変化することにより、試料中における特定成分の検出を行っている。

この測定方法は、目視によって溶液の色の変化を検出するため、特定成分が微量であると検出結果に差異が生じやすく、1 回の測定で 1 種の抗原を検出するだけであるから、多種類の抗原を測定する際には非常に煩雑な作業を要することになる。

【0007】

本発明者らは、着色ポリマー粒子の製造法および免疫測定方法に関する前記の問題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、粒径を 10  $\mu\text{m}$  以上にすることが可能であってしかも粒径がほぼ均一である着色ポリマー粒子を提供することを目的としている。

本発明の他の目的は、すべて異なる色調の着

stress, permeating into the resin particle, method which produces coloration microcapsule has been disclosed colorant.

With Japan Unexamined Patent Publication Hei 6-306108 number, it produces with emulsion polymerization method, it has disclosed concerning coloration latex particle which is dyed with poorly water-soluble colorant.

[0005]

[Problems to be Solved by the Invention]

When report of aforementioned park and others is referred to, being able to form polymer particle of relatively large particle diameter in comparison with conventional suspension polymerization, particle diameter of polymer particle becomes suitably the nonuniform.

In addition, as for discolored polymer particle which is manufactured with method which is disclosed with aforementioned disclosure, however it possesses uniform particle diameter relatively, with very particle diameter is several  $\mu\text{m}$  or less generally small particle, particle diameter as for equalization doing it is difficult with size of several tens of  $\mu\text{m}$ .

Because of this, polymer particle of particle diameter several tens of  $\mu\text{m}$  is used 1 at a time and fact that you use for measurement road which target substance identification is done is upper impossible really with each polymer particle.

[0006]

On one hand, with Japan Unexamined Patent Publication Hei 5-273210 number, particle diameter immune reaction occurring making use of colored microparticle of 10  $\mu\text{m}$  or less, it detects specific component in in sample due to fact that color of solution changes.

As for this measurement method, in order to detect change of color of solution with visual, when specific component is trace amount, difference to be easy to occur in detected result, because antigen of 1 kind is detected just with measurement of one time, when measuring antigen of the multiple kinds, it means to require troublesome job very.

[0007]

these inventors, result of diligent research, this invention reached to completion in order to solve production method of discolored polymer particle and aforementioned problem regarding immunoassay method.

Namely, this invention designates particle diameter as 10  $\mu\text{m}$  or greater, being possible densely, furthermore it offers discolored polymer particle where particle diameter is uniform almost densely it has made objective.

Other objective of this invention locking specific substance in

色ポリマー粒子に試料中の特定物質を固定して個別に測定できる分析試薬を提供することである。

【0008】

また、本発明の別の目的は、混合溶液をノズルから水溶液中に噴出させて重合し、さらに疎水性染料などを結合させて着色したポリマー粒子の製造法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、複数個の着色ポリマー粒子を用いて、複数の特定成分を同時に測定できる分析方法ないし免疫臨床診断方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために、本発明に係る着色ポリマー粒子は、疎水性モノマーと架橋剤を溶解した混合溶液を細径ノズルから、反応開始剤を溶解した水溶液中に噴出させて重合させることにより、平均粒径が 5~200  $\mu\text{m}$  であるほぼ均一な粒径を有し、さらに色素分子が結合している。

また、本発明の分析試薬は、平均粒径が 5~200  $\mu\text{m}$  であるほぼ均一な粒径を有するポリマー粒子について、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子が個別に結合し、各色素の吸光度スペクトルのピーク波長から個々に識別でき、且つそれぞれに試料中の特定物質を吸着または結合によって固定できる。

【0010】

本発明に係る着色ポリマー粒子の製造法は、疎水性モノマーおよび架橋剤を溶解して混合溶液を調製し、この溶液を細径ノズルからほぼ均一な速度で反応開始剤と界面活性剤を含む水中に噴出させ、さらに攪拌を加えて重合させることで平均粒径 5~200  $\mu\text{m}$  でほぼ均一な粒径を有し、さらに色素分子を結合させる。

本発明方法において、疎水性モノマーがスチレン、反応開始剤がラジカル重合開始剤であり、攪拌を加える反応溶液の温度をラジカル生成可能な 50~90 deg C に加温すると好ましい。

sample in discolored polymer particle of color which differs entirely is to offer the analysis reagent which it can measure individually.

[0008]

In addition, it is to offer production method of polymer particle where from the nozzle jet doing mixed solution in aqueous solution, you polymerize another objective of this invention, furthermore connects hydrophobic dye and etc colors.

Furthermore another objective of this invention is to offer analytical method or the immunity clinic diagnosis method which can measure specific component of multiple simultaneously making use of discolored polymer particle of plurality.

[0009]

[Means to Solve the Problems]

In order to achieving above-mentioned objective, discolored polymer particle which relates to this invention, from fine diameter nozzle, jet doing mixed solution which melts hydrophobic monomer and crosslinking agent in aqueous solution which melts reaction initiator almost it possesses uniform particle diameter where average particle diameter is 5 - 200;  $\mu\text{m}$  by polymerizing, furthermore dye molecule has connected.

In addition, three basic colors of red and blue, yellow or dye molecule which is these blended color be able to connect analysis reagent of this invention, individually concerning polymer particle which almost possesses uniform particle diameter where average particle diameter is 5 - 200;  $\mu\text{m}$ , be able to identify individually from peak wavelength of absorbance spectrum of each dye, At same time in each one specific substance in sample can be locked with adsorption or connection.

[0010]

production method of discolored polymer particle which relates to this invention, melting hydrophobic monomer and crosslinking agent, manufactures mixed solution, jet does this solution in underwater where from fine diameter nozzle almost reaction initiator and detergent are included with uniform velocity, by fact that you polymerize furthermore including churning possesses uniform particle diameter almost with average particle diameter 5~200 ;  $\mu\text{m}$ , furthermore connects dye molecule.

Regarding to this invention method, hydrophobic monomer styrene, reaction initiator being radical polymerization initiator, when it heats temperature of reaction solution which adds churning to radical production possible 50 - 90 deg C it is desirable.



## 【0011】

好ましくは、疎水性染料で着色するために、混合溶液に対して、水酸基を有するメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルおよび/またはカルボキシル基を有するメタクリル酸を 0.1~10%添加する。

さらに、疎水性染料による着色効率を高めるために、水によるポリマー粒子の洗浄後に、100~200 deg C で減圧乾燥することによって多孔質ポリマー粒子を得る。

## 【0012】

本発明に係る特定成分の検出方法は、平均粒径が 5~200  $\mu$ m であるほぼ均一な粒径を有するポリマー粒子について、赤、青、黄色の三原色またはこれらの混合色である色素分子を個別に結合させ、各着色ポリマー粒子に特定成分を固定し、ついで各着色ポリマー粒子の特定成分を試料と選択的に反応させてから、蛍光物質または発光物質を有する標識溶液を結合させて洗浄した後に、各着色ポリマー粒子の蛍光または発光度を測定する。

また、診断方法としては、各着色ポリマー粒子に特定の抗体を感作し、ついで各着色ポリマー粒子の抗体を検体の抗原と免疫学的に反応させてから、蛍光物質または発光物質で標識化した 2 次抗体を結合させて洗浄した後に、各着色ポリマー粒子の蛍光または発光度を測定すればよい。

## 【0013】

## 【発明の実施の形態】

本発明において、所望のポリマー粒子を製造するために、疎水性モノマーと架橋剤を含有する混合溶液を水溶液中に噴出させる細径ノズルおよびその重合反応について、下記のように必要条件を確立している。

1 ノズルに関して、混合溶液の噴出口を細くするため、噴出口径が約 0.1mm であるガラス管も作製した。

2 ポリマー粒子に関して、その粒径がノズルから噴出させる混合溶液の噴出速度と関係があることを見出した。

3 ポリマー粒子に関して、その粒径が反応容器中の溶液の回転速度と関係があることを見出し

is desirable.

## 【0011】

In order to color with preferably, hydrophobic dye, methacrylic acid which it possesses 2-hydroxyethyl methacrylate and/or carboxyl group where it possesses hydroxy group vis-a-vis mixed solution, is added 0.1- 10%.

Furthermore, in order to raise coloration efficiency with hydrophobic dye, with water after washing polymer particle, reduced pressure drying it does with 100 -200 deg C, porous polymer particle is obtained with densely.

## 【0012】

detection method of specific component which relates to this invention three basic colors of red and blue, yellow or connecting dye molecule which is these blended color individually concerning polymer particle which almost possesses uniform particle diameter where average particle diameter is 5 - 200  $\mu$ m, to lock specific component in each discolored polymer particle, after next specific component of each discolored polymer particle sample and selectively reacting, Connecting labelling solution which possesses phosphor or light emitting substance, after washing, it measures fluorescence or degree of light emitting of each discolored polymer particle.

In addition, sensitization to do specific antibody in each discolored polymer particle as the diagnosis method, connecting secondary antibody which next after reacting to antigen and immunological of test agent, labelling does antibody of each discolored polymer particle with phosphor or light emitting substance, after if washing, fluorescence or degree of light emitting of each discolored polymer particle it should have measured.

## 【0013】

## [Embodiment of the Invention]

Regarding to this invention, in order to produce desired polymer particle, mixed solution which contains hydrophobic monomer and crosslinking agent concerning fine diameter nozzle and its polymerization reaction which jet it does in aqueous solution, as description below you have established necessary condition.

In regard to 1 nozzle, in order to make spraying port of mixed solution thin, it produced also glass tube where spraying port diameter is approximately 0.1 mm.

In regard to 2 polymer particle, particle diameter is a jet velocity and a relationship of the mixed solution which jet is done from nozzle, you discovered densely.

In regard to 3 polymer particle, particle diameter is a rotational speed and a relationship of the solution in reactor,

た。

【0014】

疎水性モノマー(単量体)について、着色の容易さを考慮に入れると、水酸基および/またはカルボキシル基を有する不飽和モノマーを混合溶液の0.1~10%好ましくは0.5~5%の範囲で添加すると好適である。

疎水性モノマーに関して、これ以外に選択の条件はない。

【0015】

得たポリマー粒子について、化学的結合法で免疫活性物質を固定することを考慮すれば、シード重合時に水酸基および/またはカルボキシル基を有する不飽和モノマーを添加しておく为好ましい。

この不飽和モノマーは、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基などの官能基を有すればよく、必要に応じて適宜に選択可能であり、混合溶液の0.5%~20%の範囲で添加すると好ましい。

これらの不飽和モノマーの添加には、通常、ポリマー粒子の着色処理を同時に考慮して判断する。

【0016】

前記の混合溶液には、重合を促進する架橋剤を添加することを要する。

この架橋剤として、不飽和結合を2個以上有する化合物であるジビニルベンゼン、トリメタクリル酸トリメチロールプロパン、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジメタクリル酸ジエチレングリコール、ジメタクリル酸トリエチレングリコール、ジビニルナフタレン、ジビニルエーテル、フタル酸ジアルルなどを例示できる。

【0017】

混合溶液を噴出させる水溶液に添加する反応開始剤は、水溶性のラジカル重合開始剤であれば使用可能であり、例えば、過硫酸カリウムまたは過硫酸アンモニウムのような過硫酸塩、4,4'-アゾビス 4-シアノ吉草酸とその塩または2,2'-アゾビス(2-アミノジプロパン)塩のようなアゾ系化合物、パーオキサイト化合物などである。

この反応開始剤は、反応溶液の水温が反応開始剤の最低ラジカル生成温度以上であればよく、例えば、通常 50~90 deg C の範囲に加温する。

you discovered densely.

[0014]

Concerning hydrophobic monomer (monomer), when ease of coloration is inserted inconsideration, when unsaturated monomer which possesses hydroxy group and/or carboxyl group is added in range of 0.1 - 10% preferably 0.5~5% of mixed solution it is ideal.

In regard to hydrophobic monomer, there is not a condition of selection other than this.

[0015]

If immunity active substance is locked considers densely with chemical bond method concerning polymer particle which it acquires, at time of seed polymerization when unsaturated monomer which possesses hydroxy group and/or carboxyl group is added it is desirable.

If this unsaturated monomer, it should have possessed hydroxy group, carboxyl group, amino group, thiol group or other functional group, when according to need with selectable, it adds appropriately in 0.5% - 20% range of mixed solution, it is desirable.

Usually, considering coloring of polymer particle simultaneously, it judges in addition of these unsaturated monomer.

[0016]

crosslinking agent which promotes polymerization is added requires densely in aforementioned mixed solution.

As this crosslinking agent, divinyl benzene, trimethylolpropane trimethacrylate, diethylene glycol dimethacrylate, diethyleneglycol dimethacrylate, triethylene glycol dimethacrylate, divinyl naphthalene, divinyl ether and diallyl phthalate etc which are a compound which 2 or more it possesses unsaturated bond can be illustrated.

[0017]

reaction initiator which is added to aqueous solution which mixed solution jet is done, if it is a water soluble radical polymerization initiator, with usable, persulfate, 4,4'-azobis 4-cyano valeric acid and the its salt like for example potassium persulfate or ammonium persulfate or 2,2'-azobis is azo type compound, peroxa-ite compound etc like (2-amino di propane) salt.

If this reaction initiator, water temperature of reaction solution should have been minimum radical production temperature or higher of reaction initiator, to range of for example usually 50 - 90 deg C heats.

但し、常温開始の反応開始剤、例えば過酸化水素-還元剤(アスコルビン酸など)の組み合わせを用いれば、室温またはそれ以下の温度で重合させることも可能である。

## 【0018】

疎水性モノマーと架橋剤を含む混合溶液を噴出する水溶液に関して、含有する界面活性剤つまり分散剤として、ドデシルベンゼンスルホン酸塩、ドデシル硫酸塩、セチルトリメチルアンモニウム塩、ポリビニルアルコール、アルギン酸塩などが例示できる。

アルギン酸塩の使用は前記のパークらの報告から既知である。

## 【0019】

重合実験に際して、混合溶液の噴出口について、その口径がそれぞれ 1mm、0.5mm、0.1mm である 3 種類のノズルを使用した。

公知のペリスタポンプを用いて、混合溶液を例えば流速 0.4ml/分で水中へ噴出実験した結果、細い口径のノズルを使った方がより小さい粒子を調製できることが判明している。

## 【0020】

ノズルから噴出させる混合溶液の流出速度は、流速 0.1~5.0ml/秒の範囲で調べた結果、平均粒径が 5~200  $\mu\text{m}$  好ましくは 45~200  $\mu\text{m}$  の範囲において制御可能である。

混合溶液の流速が大きくなるに従ってポリマーの粒子径は小さくなり、その粒度分布が不均一になる傾向がある。

混合溶液の流出速度を一定にすることにより、得たポリマー粒子の粒度分布は通常の懸濁重合法より均一になる。

## 【0021】

生成ポリマーの粒子径と反応溶液の攪拌速度との関係は、使用装置によって一概に断定できないが、モータの回転速度を 20~500rpm の範囲で変更すると、回転速度が速い方がより小さいポリマー粒子を作製できる。

370rpm 以上の回転速度では、それ以上小さい粒子にはならない。

この回転速度は、攪拌子の形状や大きさ、回転する反応溶液の量、反応容器の形状や大きさなどによって反応溶液の攪拌効率に影響を与え、

However, if combination of reaction initiator, for example hydrogen peroxide-reductant (ascorbic acid etc) of ambient temperature start is used, also it is possible to polymerize with temperature of room temperature or less than that.

## 【0018】

It can illustrate dodecylbenzene sulfonate and dodecyl sulfate, cetyl trimethyl ammonium salt, polyvinyl alcohol, alginate etc in regard to aqueous solution which mixed solution which includes hydrophobic monomer and crosslinking agent as detergent clogging dispersant which is contained jet is done.

Use of alginate is known from report of aforementioned park and others.

## 【0019】

At time of polymerization experiment, concerning spraying port of the mixed solution, nozzle of 3 kinds where aperture is 1 mm, 0.5 mm, 0.1 mm respectively was used.

Making use of peristaltic pump of public knowledge, mixed solution at for example flow rate 0.4 ml/ amount the jet was experimented as for result which, particle where the person who used nozzle of thin aperture is smaller can be manufactured has been ascertained densely to underwater.

## 【0020】

As for exit rate of mixed solution which jet is done, as for the result which was inspected in range of flow rate 0.1~5.0 ml/ second, average particle diameter it is a controllable from nozzle in range of 5 - 200  $\mu\text{m}$  preferably 45~200  $\mu\text{m}$ .

flow rate of mixed solution becomes large following, particle diameter of polymer becomes small, there is a tendency where particle size distribution becomes nonuniform.

particle size distribution of polymer particle which is acquired by making exit rate of the mixed solution fixed, from conventional suspension polymerization method becomes uniform.

## 【0021】

It cannot be related between particle diameter of produced polymer and stirring speed of reaction solution, with adopted equipment unconditionally assertion. When rotational speed of motor is modified in range of 20 - 500 rpm, polymer particle where one where rotational speed is fast is smaller can be reproduced.

With rotational speed of 370 rpm or greater, above that it does not become small particle .

This rotational speed, shape and size, of stirrer produces effect on stirring efficiency of the reaction solution with such as quantity of reaction solution which turns and shape and

この攪拌効率が粒子径を左右していることは事実である。

【0022】

重合反応で得たポリマー粒子は、例えば、ポリスチレン、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリメタクリル酸エチル、ポリメタクリル酸 n-ブチル、ポリメタクリル酸 i-ブチル、ポリメタクリル酸 2-エチルヘキシルメタクリル酸ラウリル、ポリメタクリル酸 S ラウリル、ポリメタクリル酸ドデシルペンタデシル、ポリメタクリル酸ステアリル、ポリメタクリル酸グリシジル、ポリメタクリル酸 2-ヒドロキシエチル、ポリメタクリル酸ヒドロキシプロピル、ポリメタクリル酸ジエチルアミノエチル、ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル、ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチルメチルクロライド塩、ポリメタクリル酸アリル、ポリメタクリル酸シクロヘキシル、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル、ポリカブラミド、ポリエチレンテレフタレートなどである。

特に、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルは、0.1~10%の範囲で含有する水酸基やカルボキシル基がポリマー粒子を着色する際に有効である。

【0023】

ポリマー粒子は、アセトン、メタノール、1N-塩酸、1N-水酸化ナトリウム、ミリ Q 水の順に数回ずつ遠心洗浄することにより、未反応のモノマー(例えばスチレン)臭が消える。

モノマー臭が消えない場合は、さらに同じ洗浄工程を繰り返すことによって解決できる。

水によってポリマー粒子を洗浄した後に、疎水性染料による着色効率を高めるために、100~200 deg C で減圧乾燥してポリマー粒子を多孔質にすると好ましい。

【0024】

次に、着色用の色素分子として、疎水性染料である反応染料、分散染料、スチレン染料、酸性染料、含金属染料、酸性媒染染料、直接染料、カチオン染料、塩基性染料、硫化染料、油溶性染料などを挙げることができる。

これらの染料のうちで、水酸基やカルボキシル基を含むポリマー粒子には、疎水性染料が結合が容易で反応効率がよい色素分子である。

すなわち、反応溶液を水酸化ナトリウムなどでアルカリ性にするにより、疎水性染料はポリマー粒子の水酸基やカルボキシル基と共有結合を形成する。

size of the reactor, it is secure for this stirring efficiency to have influenced particle diameter.

【0022】

polymer particle which is acquired with polymerization reaction, is for example polystyrene, poly methacrylic acid, polymethylmethacrylate, poly ethyl methacrylate, poly n-butyl methacrylate, poly i-butyl methacrylate, poly methacrylic acid 2-ethylhexyl lauryl methacrylate, poly methacrylic acid Slauryl, poly dodecyl methacrylate pentadecyl, poly stearyl methacrylate, poly glycidyl methacrylate, poly 2-hydroxyethyl methacrylate, poly hydroxypropyl methacrylate, poly diethylaminoethyl methacrylate, poly dimethylmethacrylate amino ethyl and poly dimethylmethacrylate amino ethyl methyl chloride salt, poly allyl methacrylate, poly cyclohexyl methacrylate, polyacrylonitrile, poly methacrylonitrile, polycapramide, polyethylene terephthalate etc.

Especially, poly methacrylic acid, poly 2-hydroxyethyl methacrylate when hydroxy group and carboxyl group which are contained in 0.1 - 10% ranges color polymer particle, is effective.

【0023】

As for polymer particle, unreacted monomer (for example styrene) odor goes out several times centrifugation by each washing in order of acetone, methanol, 1 N- hydrochloric acid, 1 N- sodium hydroxide, milli Q water.

When monomer odor does not go out, furthermore same washing step is repeated, it can solve with densely.

After washing polymer particle with water, in order to raise coloration efficiency with hydrophobic dye, reduced pressure drying doing with 100 - 200 deg C, when it designates polymer particle as porous, it is desirable.

【0024】

Next, reactive dye, dispersed dye, styrene dye, acidic dye, metal containing dye, chrome dye, direct dye, cationic dye, basic dye, sulphur dye, oil-soluble dye etc which is a hydrophobic dye as dye molecule for coloration, can be listed.

Among these dye, hydrophobic dye connection being easy, it is a dye molecule where reaction efficiency is good in polymer particle which includes hydroxy group and the carboxyl group.

hydrophobic dye hydroxy group and carboxyl group and covalent bond of polymer particle is possible namely, reaction solution with such as sodium hydroxide making alkaline by.

合できる。

【0025】

用いる疎水性染料について、黄色染料には、商品名:Kayaset Yellow 2G、Yellow E-3G、Yellow E-G、Yellow F-RL、Yellow P-3R、Yellow GN、Yellow R liq.、Brilliant Yellow 4GE-CF、Yellow P-6GS、YellowC-5G、Yellow 2G-E、Yellow F-3R、Yellow Light、Yellow K-R、Yellow P-GL、Yellow CN-4G、Yellow A-3R、Yellow P-S8G、Yellow GR、Yellow 3RK などがある。

【0026】

青色染料には、商品名:Kayaset Blue N、Blue E-R、Blue E-RTN、Blue E-3G、Blue F-R、Brilliant Blue P-BR、Brilliant Blue P-3R、Brilliant Blue RN-S、Brilliant Blue BNF、Brilliant Blue RB-CF、Blue P-3R、Blue C-R、Blue 4R、Blue TR-E、Blue H-GN、Blue X-3LR、Brilliant Blue VS-RW、Brilliant Blue VS-R、Blue CN-R、Blue E-MS、Blue E-NB などがある。

【0027】

また、赤色染料として、商品名:Kayaset Red B、Red E-B、Red E-RTN、Brilliant Red P-B、Brilliant Red FD P-BN、Brilliant RedG、Brilliant Red RBB、Brilliant Red 5BN、Brilliant Red 2BE-CF、Brilliant Red K-4BL、Brilliant Red K-BGN、Brilliant Red X-2B、Red X-6BN、Brilliant Red 4G-E、Red CN-3B、Red CN-7B、Brilliant Red BB、Red H-3B、Red CX-4B、Red H-EXLなどを挙げることができる。

【0028】

本発明方法によって得た着色ポリマー粒子は、インクや塗料などの着色剤として、そのままの状態で使用してもよく、または各種の添加剤を加え、例えばインクの場合には調節剤および防腐剤などを加えて使用してもよい。

また、着色ポリマー粒子を乾燥し、各種の樹脂成形品の着色剤などとして用いることも可能である。

【0029】

着色ポリマー粒子の用途には、その粒度分布や分散安定性などの性能に高精度な制御を必要とするものがあり、例えば、臨床診断試薬、農薬や環境汚染物質などの分析試薬などに応用できる。

着色ポリマー粒子を免疫測定法に使用できる診断試薬とするためには、抗体のような免疫活性

【0025】

There is a tradename:Kayaset Yellow 2G、Yellow E-3G、Yellow E-G、Yellow F-RL、Yellow P-3R、Yellow GN、Yellow R liq.、Brilliant Yellow 4GE-CF、Yellow P-6GS、YellowC-5G、Yellow 2G-E、Yellow F-3R、Yellow Light、Yellow K-R、Yellow P-GL、Yellow CN- 4G、Yellow A-3R、Yellow P-S8G、Yellow GR、Yellow 3RK etc in yellow dye concerning hydrophobic dye which it uses.

【0026】

There is a tradename:Kayaset Blue N、Blue E-R、Blue E-RTN、Blue E-3G、Blue F-R、Brilliant Blue P-BR、Brilliant Blue P-3R、Brilliant Blue RN- S、Brilliant Blue BNF、Brilliant Blue RB-CF、Blue P-3R、Blue C-R、Blue 4R、Blue TR-E、Blue H-GN、Blue X-3LR、Brilliant BlueV S-RW、Brilliant BlueV S-R、Blue CN- R、Blue E-MS、Blue E-NB etc in blue dye .

【0027】

In addition, tradename:Kayaset RedB、Red E-B、Red E-RTN、Brilliant Red P-B、Brilliant Red FD P-BN、Brilliant RedG、Brilliant Red RBB、Brilliant Red 5BN、Brilliant Red 2BE-CF、Brilliant Red K-4BL、Brilliant Red K-BGN、Brilliant Red X-2B、Red X-6BN、Brilliant Red 4G-E、Red CN- 3B、Red CN- 7B、Brilliant RedB B、Red H-3B、Red CX-4B、Red H-EXL etc can be listed as red dye.

【0028】

It is possible to use discolored polymer particle which is acquired with this invention method , withthat way embodiment as ink and paint or other colorant, or including various additive, in case of for example ink including regulator and antiseptic etc touse it is possible.

In addition, to dry discolored polymer particle, also it is possible to use as colorant etc of various resin molding.

【0029】

There are some which need highly precise control in particle size distribution and dispersion stability or other performance in application of discolored polymer particle, can apply to for example clinic diagnosis reagent、 pesticide and environmental contaminant or other analysis reagent etc.

In order to make diagnosis reagent which can use discolored polymer particle for immunoassay method, itis necessary to

物質を着色ポリマー粒子に固定化する必要がある。

【0030】

着色ポリマー粒子を免疫学的診断試薬とするために、その粒子表面に免疫活性物質を固定することを要する。

免疫活性物質の固定化には、一般に物理的吸着法と化学的結合法が知られている。

【0031】

物理的吸着法は、免疫活性物質を疎水性表面に物理的に吸着して固定する方法である。

例えば、スチレンまたはその誘導体、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステルなどによるポリマー粒子では、免疫学的に活性な部位例えば (Fab)' が吸着されない形で容易に固定することができる。

当然のことながら、抗体として IgG を使用する場合には、代わりに Fc フラグメントを消化した (Fab')<sup>2</sup> や Fab' を用いてもよい。

【0032】

一方、化学的結合法では、着色ポリマー粒子として、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基などの官能基を有する不飽和モノマーを共重合させたポリマーを用いると好ましい。

この着色ポリマー粒子には、公知の二官能性試薬を添加して免疫活性物質を反応させ、共有結合で固定することが可能である。

この不飽和モノマーは、シード重合時に添加しておけばよく、例えば、水酸基を持つメタクリル酸 2-ヘドロキシエチルやメタクリル酸ヒドロキシプロピル、カルボキシル基を持つメタクリル酸などであり、混合溶液の 0.5%~20%の範囲で含有すると好ましい。

【0033】

この明細書において、免疫活性物質は、抗原、抗体またはレセプターなどであり、例えば、C 反応性タンパク質、ヒト IgG、ヒト IgA、ヒト IgM、ヒト IgE、ヒト IgD、癌胎児性抗原(CEA)、 $\beta$  2-ミクログロブリン、フェリチン、TPA、IAP(免疫抑制酸性タンパク)、尿中ポリアミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、DUPAN-2、CA19-9、CA-50、CA15-3、前立腺特異抗原(PA)、CA-125、CA-130、CA602、CA72-4、神経特異エノラーゼ、APO-AI、APO-AII、APO-B、APO-CII、APO-CIII、APO-E) などのポリボタンパク、 $\alpha$ 1-ミクログロブリン、 $\alpha$ 2-

fix immunity active substance like antibody in discolored polymer particle.

[0030]

In order to designate discolored polymer particle as immunological diagnosis reagent, immunity active substance is locked requires densely in particle surface.

physical adsorption method and chemical bond method are known generally in fixation of the immunity active substance.

[0031]

physical adsorption method is method which adsorbing into physical in hydrophobic surface, locks immunity active substance.

It can lock with polymer particle, easily with such as for example styrene or its derivative, acrylic acid ester, methacrylic acid ester is not adsorbed in immunological active site for example (Fab)' in form which.

obvious thing, when IgG is used as antibody, Fc fragment digestion was done in substituting, (Fab' ) making use of <sup>2</sup> and Fab' ; it is good.

[0032]

On one hand, with chemical bond method, when polymer which copolymerizes the unsaturated monomer which possesses hydroxy group, carboxyl group, amino group, thiol group or other functional group as discolored polymer particle, is used it is desirable.

In this discolored polymer particle, adding bifunctional reagent of public knowledge, reacting, it locks the immunity active substance it is possible densely with covalent bond.

If this unsaturated monomer should have added at time of seed polymerization, when it contains, in 0.5% - 20% range of mixed solution with such as methacrylic acid 2- sludge キシエチル which has for example hydroxy group and methacrylic acid which has hydroxypropyl methacrylate, carboxyl group is desirable.

[0033]

In this specification, immunity active substance, for example C reactivity protein, human IgG, human IgA, human IgM, human IgE, human IgD, cancer fetal antigen with such as antigen, antibody or receptor (CEA), the;be2 -micro globulin, ferritin, TPA, IAP (immunosuppression acidic protein), polyamine, ;al in urine - フェ jp7 protein, DUPAN- 2, CA19-9, CA-50, CA15-3, prostate unique antigen (PA), CA-125, CA-130, CA602, CA72- 4, nerve unique enolase, APO-AI, APO-AII, APO-B, APO-CI I, APO-CI

マイクログロブリン、尿中アルブミン、C3、C4、ハプトグロビン、HBs 抗原、HCV 抗体、抗ストレプトリジン-O(ASO)、カンジダ抗原、アスペルギルス抗原、梅毒(TPHA)、リウマチ因子などの検査項目物質である。

同様に、犬、猫、牛、馬、豚のような動物について、その抗原や抗体などを測定することも可能である。

#### 【0034】

この明細書において、抗原とは、人あるいは動物に対して抗体産生を惹起する能力のあるすべての物質のうちで、診断などの特別の目的の下に選択された単一ないし複数の物質またはそれらを含有する混合物を意味している。

抗原に対して特異的に結合するのは、通常、その抗体(モノ、またはポリクローナル抗体)である。

また、免疫活性物質として、メトトレキセート(抗ガン剤)に特異的に結合する DNA オリゴマーを用い、精製したオリゴマーに蛍光物質をラベルして抗原などを測定することも可能である。

#### 【0035】

着色ポリマー粒子は、農薬や環境汚染物質などの分析試薬にも応用できる。

この例として、環境汚染物質として指摘されるダイオキシン、田畑やゴルフ場に散布される除草剤、森林に散布される殺虫剤、野菜に付着する各種の農薬の測定に用いることができる。

#### 【0036】

蛍光または発光物質を結合させた着色ポリマー粒子は、色差計を用いて、蛍光度と色調を測定できる。

蛍光測定装置として、表面に直径約 150  $\mu$ m の孔 10000 個を分散形成したマイクロチェンバープレートを用いると、特定成分を固定してから試料と選択的に反応させた着色ポリマー粒子を前記の孔に 1 個ずつ入れ、個々に標識溶液を滴下することにより、多数の試験項目を同時に行うことが可能である。

#### 【0037】

#### 【実施例】

次に、本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

II, APO-E) or other poly protein, the; al 1 -micro globulin, the; al 2 -micro globulin, urine medium albumin, C3, C4, ハプ jp7 globin, HBs antigen, HCV antibody, anti- ス pick-up プ toline-O (ASO), Candida antigen, Aspergillus antigen, syphilis (TPH A), is rheumatism factor or other inspection item substance.

In same way, also it is possible to measure antigen and the antibody etc dog, cat, cattle, horse, concerning animal like swine.

#### [0034]

In this specification, antigen, among all substance which have capacity which causes antibody production vis-a-vis person or animal, single which is selected under diagnosis or other special objective it does to be, the substance of multiple or blend which contains those it means.

Fact that it connects to specific vis-a-vis antigen, usually, is antibody (mono, or polyclonal antibody).

In addition, label doing phosphor in oligomer which was refined making use of DNA oligomer which is connected to specific in methotrexate (anticancer agent) as immunity active substance, also it is possible to measure antigen etc.

#### [0035]

It can apply to also pesticide and environmental contaminant or other analysis reagent discolored polymer particle.

In dioxin, field and golf course which are pointed out as this example, as environmental contaminant you can use for measurement of various pesticide which deposit in insecticide, vegetable which scattering fabric is done in herbicide, forest which scattering fabric is done.

#### [0036]

discolored polymer particle which connects fluorescence or light emitting substance can measure fluorescence and color making use of color difference meter.

As fluorescence measuring apparatus, when micro chamber plate which it dispersed formed 10000 holes of diameter approximately 150  $\mu$ m is used for surface, after locking specific component, sample and selectively you insert each 1 discolored polymer particle which reacts in aforementioned hole, you do multiple test item simultaneously by dripping labelling solution individually, it is possible densely.

#### [0037]

#### [Working Example(s)]

Next, this invention is explained on basis of Working Example, but this invention is not something which is limited

本発明は実施例に限定されるものではない。

【0038】

実施例

着色ポリマー粒子による臨床診断

【0039】

ポリマー粒子の調製

スチレン 90%、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル 7%、メタクリル酸 1.5%、ジビニルベンゼン 1.5% を混ぜて混合溶液を調製する。

2 リットルの反応容器には、ミリ Q 水 1 リットル、ペルオキシニ硫酸カリウム 1g、アルギン酸ナトリウム 10g を入れ、良く溶解させる。

この反応容器は、窒素の封入下にマントルヒータで 85 deg C に温度を上げた後に、前記のスチレン系混合溶液 200ml を口径 0.25mm の自作のガラスノズルから、ペリスタポンプを使って流速 0.4ml/分 でゆっくり注入する。

この反応時の攪拌モータの回転速度は 200rpm である。

混合溶液を約 8 時間で注入し終えた後に、前記の攪拌回転速度を維持しながら、85 deg C で 25 時間重合反応を継続する。

電子顕微鏡(SEM)写真で計測すると、調製したポリマー粒子の平均粒径は 112.4  $\mu$ m であった。

また、このポリマー粒子をミリ Q 水で 10 回遠心洗浄した後に、水 1 リットルに分散させて固形分を測定すると、固形分は 8.2% である。

【0040】

ポリマー粒子の着色

前記のポリマー粒子分散液 80ml を反応容器に入れ、攪拌モータによって 200rpm で攪拌しながら、液温を 85 deg C まで上昇させる。

疎水性染料(商品名:Kayaset Red B、日本化薬製)2g を室温でメタノール 60ml に溶解し、濾過した後に、その濾液 40ml を反応容器に加える。

また、同じ疎水性染料 2g を室温でトルエン 50ml に溶解し、濾過した後に、その濾液 20ml を反応容器に 30 分間かけてゆっくりと滴下する。

滴下完了後、85 deg C で 8 時間攪拌を継続する。

in Working Example.

[0038]

Working Example(s)

With discolored polymer particle clinic diagnosis

[0039]

Manufacturing polymer particle

Mixing styrene 90%、 2-hydroxyethyl methacrylate 7%、 methacrylic acid 1.5%、 divinyl benzene 1.5%、 it manufactures mixed solution.

You insert milli Q water 1 liter、 potassium peroxydisulfate 1g、 sodium alginate 10g into reactor of 2 liter、 meltwell.

This reactor, after under enclosing nitrogen increasing temperature to 85 deg C with mantle heater, from original glass nozzle of aperture 0.25 mm, using the peristaltic pump, fills aforementioned styrenic mixed solution 200 ml slowly at flow rate 0.4 ml/ amount.

rotational speed of stirring motor of this reaction time is 200 rpm.

While approximately filling mixed solution with 8 -hour and afterfinishing, maintaining aforementioned churning rotational speed, it continues 25 hours polymerization reaction with 85 deg C.

When it measures with electron microscope (SEM ) photograph, average particle diameter of polymer particle which is manufactured was 112.4  $\mu$ m.

In addition, 10 times centrifugation after washing with milli Q water, dispersing this polymer particle to water 1 liter when it measures solid component, solid component is 8.2%.

[0040]

Coloration of polymer particle

While inserting aforementioned polymer particle dispersion 80 ml in reactor, with stirring motor agitating with 200 rpm, liquid temperature it rises to 85 deg C.

hydrophobic dye (tradename:Kayaset RedB、 Nippon Kayaku Co. Ltd. (DB 69-054-7468 ) make) 2 g are melted in methanol 60 ml with room temperature, after filtering, filtrate 40 ml is added to reactor.

In addition, it melts same hydrophobic dye 2g in toluene 50 ml with room temperature, after filtering, 30 min applying filtrate 20 ml in reactor, it drips slowly.

After completing dripping, 8 -hour it continues churning with 85 deg C.



この粒子を 500mM のリン酸水素二ナトリウムで 5 回遠心洗浄した後に、ミリ Q 水で 5 回洗浄すると、赤色ポリマー粒子を調製できる。

着色ポリマー粒子をアルカリ性塩のリン酸水素二ナトリウム溶液に浸すことにより、色褪せすることを抑制できる。

#### 【0041】

黄色染料(商品名:Kayaset Yellow 2G)、青色染料(商品名:Kayaset Blue N)、黒色染料(商品名:Kayaset Black A-N)、橙色染料(商品名:Kayaset Orange A-N)、藍色染料(商品名:Kayaset Blue A-D)を用い、前記と同様の方法によって、6 色の着色ポリマー粒子を調製できる。

また、赤色染料と黄色染料と黒色染料を 5:25:1 の比率で用いて茶色ポリマー粒子、赤色染料と青色染料を等量用いて紫色ポリマー粒子、青色染料と黄色染料を 10:1 の比率で用いて緑色ポリマー粒子を調製する。

これらに無着色の白色ポリマー粒子を加えて、全部で 10 種類の色バリエーションを作製できる。

#### 【0042】

着色ポリマー粒子への抗体の感作

赤色ポリマー粒子について、ミリ Q 水で遠心洗浄後に上清を取り除く。

残った赤色ポリマー粒子 100mg を、20mM リン酸緩衝液 A(pH6.8、0.9%NaCl、0.05%Na<sub>3</sub>)10ml に分散させる。

この溶液に WSC(Water Soluble Carbodimide、同仁化学研究所製)0.1g を加え、ボルテックスミキサーで良く攪拌した後に、3 時間室温で放置する。

このポリマー粒子を前記のリン酸緩衝液 10ml で 5 回遠心洗浄し、反応しなかった WSC を除去する。

この WSC 処理により、メタクリル酸由来のカルボキシル基をアミノエステル化して抗体のアミノ基に結合しやすくなる。

#### 【0043】

洗浄した赤色ポリマー粒子(正味 100mg)を 20mM リン酸緩衝液(pH6.8、0.9%NaCl、0.05%Na<sub>3</sub>)10ml に分散し、この分散溶液に抗インフルエンザ A 抗体(0.1mg、マウス由来モノクローナル抗体、アイ・アイ・シー・ジャパンから購

When this particle with disodium hydrogen phosphate of 500 mM 5 time centrifugation afterwashing, 5 times is washed with milli Q water, red color polymer particle can be manufactured.

Color 褪 せ it does by dampening discolored polymer particle in disodium hydrogen phosphate solution of alkaline salt, you can control densely.

#### 【0041】

yellow dye (tradename:Kayaset Yellow 2G), blue dye (tradename:Kayaset Blue N), black dye (tradename:Kayaset Black A-N), amber dye (tradename:Kayaset orange A-N), making use of cyan color dye (tradename:Kayaset Blue A-D), with method which is similar to description above, discolored polymer particle of 6 colors can be manufactured.

In addition, 5: 25: using red dye and yellow dye and black dye with ratio of 1, equivalent using brown color polymer particle, red dye and blue dye, 10: using the violet polymer particle, blue dye and yellow dye with ratio of 1, it manufactures green color polymer particle.

In these color variation of 10 types can be produced with all including white polymer particle of uncolored.

#### 【0042】

sensitization of antibody to discolored polymer particle

Concerning red color polymer particle, with milli Q water supernatant is removed after centrifugation washing.

red color polymer particle 100 mg which remains, 20 mM phosphate buffer A (pH 6.8, 0.9%NaCl, 0.05%Na<sub>3</sub>) is dispersed to 10 ml.

In this solution being a vortex mixer after agitating well, it leaves with 3 hours room temperature WSC (Water Soluble Carbodimide, Dojindo Laboratories make) including 0.1 g.

This polymer particle 5 time centrifugation is washed with aforementioned phosphate buffer 10 ml, the WSC which does not react is removed.

With this WSC treatment, amino esterification doing carboxyl group of methacrylic acid derivation, it connects to amino group of antibody and becomes theanther.

#### 【0043】

20 mM phosphate buffer (pH 6.8, 0.9%NaCl, 0.05%Na<sub>3</sub>) it disperses red color polymer particle (net 100 mg) which you washed to 10 ml, after with room temperature agitating with 30 min, shaker including anti- influenza Antibody (0.1 It purchases from mg, mouse derivative monoclonal

入)を加え、室温で 30 分間、シェーカーで攪拌した後に、3 日間冷蔵保存する。

この赤色ポリマー粒子を 20mM リン酸緩衝液 B(pH6.8、0.9%NaCl、0.05%NaN<sub>3</sub>、0.5%牛血清アルブミン、0.1%カゼイン)10ml で 5 回遠心洗浄を行った後に、20mM リン酸緩衝液 A(pH6.8、0.9%NaCl、0.05%NaN<sub>3</sub>)10ml に置換させる。

沈殿物が凝集していた場合には、超音波を照射して分散させればよい。

#### 【0044】

他の 9 種のポリマー粒子には、前記の赤色ポリマー粒子と同様に処理して、それぞれ異なる感染症に関する抗体を感作する。

すなわち、黄色ポリマー粒子には抗クラミジア・トラコマチス抗体(IgG2)(LPS)、青色ポリマー粒子には抗サルモネラ・sp 抗体、黒色ポリマー粒子には抗単純ヘルペスウイルス 1 抗体(IgG2)(gC)、橙色ポリマー粒子には抗トレポネマ・パリダム(梅毒)抗体、藍色ポリマー粒子には抗ナイセリア・ゴノヘイア抗体(IgG2)(outer mem.)、茶色ポリマー粒子には抗ヘリコバクター・ピロリ抗体、紫色ポリマー粒子には抗マイコプラズマ・ニューモニア抗体(IgG1)(surface)、緑色ポリマー粒子には抗 HBs ウイルス抗体(IgG2)(ad&ay)、無着色の白色粒子には抗 HCV 抗体(capsid)を感作する。

#### 【0045】

##### 蛍光標識した 2 次抗体の調製

2 次抗体として、(1)抗インフルエンザ A 抗体[(USSR 型(H1N1)、ヤギ由来 IgG 分画]、(2)抗クラミジア・トラコマチス抗体[L2+亜型、ヤギ由来 IgG 分画]、(3)抗サルモネラ・sp.抗体[O-抗原&H-抗原、ウサギ由来 IgG 分画]、(4)抗単純ヘルペスウイルス 1 抗体[ウサギ由来 IgG2 分画]、(5)抗トレポネマ・パリダム(梅毒)抗体[ウサギ由来 IgG 分画]、(6)抗ナイセリア・ゴノヘイア(淋病)抗体[ATCC31426、ウサギ由来 IgG 分画]、(7)抗ヘリコバクター・ピロリ抗体[ATCC43504、ウサギ由来 IgG 分画]、(8)抗マイコプラズマ・ニューモニア抗体[ウサギ由来 IgG 分画]、(9)抗 HBs ウイルス抗体[ad&ay、ウサギ由来 IgG 分画]、(10)抗 HCV ウイルス抗体[capsid&NS]である 10 種のポリクローナル抗体を用いる。各抗体 3mg に 0.03mg の FITC(Fluorescein Isothiocyanate Isomer I、同仁化学研究所製)を反応させ、DEAE カラムで分画した結果、波長 280nm で吸光度を測定すると

antibody、eye \* eye \* C. Japan ), 3 -day period cold storage it makes in this dispersed solution.

This red color polymer particle 20 mM phosphate buffer B (pH 6.8、0.9%NaCl、0.05%NaN<sub>3</sub>、0.5% bovine serum albumin、0.1% casein ) after doing 5 time centrifugation washing with 10 ml,20 mM phosphate buffer A (pH 6.8、0.9%NaCl、0.05%NaN<sub>3</sub> ) is substituted in 10 ml.

When precipitate has cohered, irradiating ultrasound, if it should have dispersed.

#### 【0044】

Treating in same way as aforementioned red color polymer particle, sensitization it does antibody regarding infection which differs respectively in the polymer particle of other 9 kinds.

In namely, yellow polymer particle anti- Chlamydia \* jp7 ラ frame jp8 ス antibody (IgG2 ) (LPS ), in blue polymer particle in anti- Salmonella \* sp antibody、black polymer particle anti- herpes simplex virus 1 antibody (IgG2 ) (gC ), in amber polymer particle in anti- Treponema \* Paris dam (syphilis ) antibody、cyan color polymer particle to anti- Neisseria \* gonorrhea antibody (IgG2 ) (outer mem. ), in brown color polymer particle in anti- Helicobacter pylori antibody、violet polymer particle anti- mycoplasma \* new near antibody (IgG1 ) (surface ), in green color polymer particle anti- HBs virus antibody (IgG2 ) (ad&ay ), anti- HCV antibody (capsid ) sensitization is done to white particle of uncolored.

#### 【0045】

fluorescent label is done manufacturing secondary antibody which

As secondary antibody, (1) anti- influenza A antibody [(USSR type (H1N1), goat derivative IgG fraction]、(2) anti- Chlamydia \* jp7 ラ frame jp8 ス antibody [L2+subtype、goat derivative IgG fraction ], (3) anti- Salmonella \* sp. antibody [O-antigen&H-antigen、rabbit derivative IgG fraction ], (4) anti- herpes simplex virus 1 antibody [rabbit derivation IgG2 min picture], (5) anti-Treponema \* Paris dam (syphilis ) antibody [rabbit derivative IgG fraction ], gonorrhea antibody [ATCC31426、rabbit derivative IgG fraction ], (7) anti- Helicobacter pylori antibody [ATCC43504、rabbit derivative IgG fraction ], (8) anti- mycoplasma \* new near antibody [rabbit derivative IgG fraction ], (9) anti- HBs virus antibody [ad&ay、rabbit derivative IgG fraction ], polyclonal antibody of 10 kinds which are a (10) anti- HCV virus antibody [capsid&NS ] is used to (6) anti- Neisseria \* gonorrhea. Result in each antibody 3 mg reacting, fraction of doing FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer I、Dojindo Laboratories make) of 0.03 mg with DEAE column, when absorbance is measured with

42%~58%の回収率を得る。FITC 標識したこれらのポリクローナル抗体を 20mM リン酸緩衝液 C(pH6.8、0.9%NaCl、0.05%NaN<sub>3</sub>、0.2%牛血清アルブミン、1%界面活性剤)で希釈し、その濃度を 0.01mg/ml に調整する。これらの抗体溶液を 100  $\mu$ l ずつ試験管に入れ、ボルテックスミキサーで良く攪拌し、約 1ml の標識抗体(2 次抗体)溶液とする。}}

【0046】

免疫学的反応とその測定

各抗体を感作した 10 種の着色ポリマー粒子を 2 個ずつ取り出して試験管に入れ、さらに 100  $\mu$ l の 20mM リン酸緩衝液 C を加える。

この溶液に、健常者の血清で 100 倍希釈したクラミジア抗原(アイ・アイ・シー・ジャパンから購入)を 10  $\mu$ l 添加し、室温で 1 時間反応させた後に、20mM リン酸緩衝液 C で 5 回遠心洗浄する。

四角錐の孔を 10000 個設けたマイクロチェンバープレートを用い、該プレートの個々の孔に反応済みの着色ポリマー粒子を 1 個ずつ挿入する。

【0047】

前記で調製済みの標識抗体(2 次抗体)溶液を、着色ポリマー粒子を 1 個ずつ入れたプレート孔に 1 滴ずつ滴下し、室温で 1 時間反応させる。

プレート孔内の着色ポリマー粒子をそれぞれ 20mM リン酸緩衝液 C で洗浄した後に、蛍光測定装置によって粒子表面の蛍光を観察する。

この結果、2 個の黄色ポリマー粒子だけに FITC の蛍光度(波長 500nm)が認められた。

【0048】

同様に、各抗原を含有する血清または血漿を反応させることにより、多数の感染症の測定を定性的に観察できることが明白である。

ポリマー粒子 1 個毎の色を観察するには反射型顕微鏡(倍率 500 倍)を用いる。

この実施例では感染症関連の項目を対象に実施したが、例えば癌マーカーの測定などに用いると、1 回の蛍光測定で約 1 万項目まで同時に測定可能である。

【0049】

wavelength 280 nm, obtains 42% - 58% recovery ratio. These polyclonal antibody which FITC labelling are done are diluted with 20 mM phosphate buffer C (pH 6.8, 0.9%NaCl, 0.05%NaN<sub>3</sub>, 0.2% bovine serum albumin, 1% detergent ), the concentration is adjusted 0.01 mg/ml. You insert these antibody solution in test tube, 100;mu l at a time being a vortex mixer agitate well, make labelled antibody (secondary antibody ) solution of approximately 1 ml. )}

[0046]

immunological reaction and measurement

Removing 2 at a time discolored polymer particle of 10 kinds which each antibody sensitization are done, you insert in test tube, furthermore add 20 mM phosphate buffer C of 100;mu l.

In this solution, 100 times is diluted 10;mu l it adds Chlamydia antigen (It purchases from eye \* eye \* C. Japan ) which with blood serum of normally healthy person, with room temperature 1 hour reaction later, 5 time centrifugation washes with 20 mM phosphate buffer C.

discolored polymer particle of reaction being completed is inserted 1 at a time in individual hole of said plate making use of micro chamber plate which provides 10000 holes of tetragonal pyramid.

[0047]

It drips 1 drop at a time labelled antibody (secondary antibody ) solution of manufacturing being completed, to plate hole which inserted 1 at a time the discolored polymer particle with description above, 1 hour reacts with room temperature.

After washing discolored polymer particle of plate borehole respectively with 20 mM phosphate buffer C, fluorescence of particle surface is observed with fluorescence measuring apparatus .

As a result, it could recognize fluorescence (wavelength 500 nm ) of FITC in just the yellow polymer particle of 2.

[0048]

In same way, measurement of multiple infection can be observed is clearly in qualitative blood serum or blood plasma which contains each antigen by reacting.

Color every of polymer particle 1 is observed, reflective type microscope (magnification 500-power ) is used.

With this Working Example infection-RELATED item was executed in object, but when it uses for measurement etc of for example cancer marker, with fluorescence measurement of one time it is a measurable simultaneously to approximately 10,000 item.

[0049]

## 【発明の効果】

本発明に係る着色ポリマー粒子は、粒径がほぼ均一であるので粒子 1 個ずつで対象物質を同定するような用途に使用可能である。

このポリマー粒子には、赤、青、黄色の三原色を含む各色の色素分子が個別に結合し、各色素の吸光度スペクトルのピーク波長から非常に多数に識別できることにより、試料中の特定物質を固定して個別に測定する分析試薬などとして適用できる。

本発明の着色ポリマー粒子は、多種類の物質を一時に同定することにより、臨床診断試薬、ダイオキシンのような環境汚染物質や農薬などの分析試薬、遺伝子の分類または遺伝子の診断試薬、医薬品の検査、生化学分野などに適用可能である。

## 【0050】

本発明に係る製造法は、粒径がほぼ均一のポリマー粒子を得るために、疎水モノマーを主成分とする混合溶液を水中に噴出させるだけの容易な方法である。

本発明の分析方法は、1 試験項目に対して 1 個のポリマー粒子で定性できるので製造原価が安く、試薬量を少量化でき、さらに検査項目の選択が自由であるうえに、色差計を用いて多種類の着色ポリマー粒子を同時に識別でき、多項目の同時測定が可能である。

本発明の臨床診断方法は、免疫反応について非常に多くの項目を一回の測定で短時間に同時測定が可能となり、DNA 診断へも応用可能である。

## [Effects of the Invention]

Because as for discolored polymer particle which relates to this invention, particle diameter is the uniform almost with each particle 1 it is a usable in application which the target substance identification is done.

dye molecule of red and each color which includes three basic colors of blue, yellow can connect to this polymer particle, individually, locking specific substance in sample by from peak wavelength of absorbance spectrum of each dye being able to identify very in large number, can apply as analysis reagent etc which it measures individually.

discolored polymer particle of this invention, is applicable in classification of environmental contaminant and pesticide or other analysis reagent, gene like clinic diagnosis reagent, dioxin substance of multiple kinds at one time by identification doing, or inspection and biochemistry field etc of diagnosis reagent, drug of gene.

## [0050]

production method which relates to this invention because particle diameter almost obtains polymer particle of uniform, mixed solution which designates hydrophobic monomer as the main component is sufficient easy method which jet is done in underwater.

Because analytical method of this invention qualitative is possible with polymer particle of 1 vis-a-vis 1 test item, production cost to be cheap, to trace be able to convert reagent quantity, furthermore in addition to fact that selection of inspection item is free, be able to identify discolored polymer particle of the multiple kinds simultaneously making use of color difference meter, simultaneous measurement of multi item is possible.

As for clinic diagnosis method of this invention, very many item simultaneous measurement to short time becomes possible with one-time measurement concerning immune reaction, it is application possible even to DNA diagnosis.